

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-099481

(43)Date of publication of application : 31.03.1992

(51)Int.Cl.

C12N 1/20
A61K 35/74
A61K 39/39
// (C12N 1/20
C12R 1:01)

(21)Application number : 02-218599

(71)Applicant : CHIBA SEIFUN KK

MIZUNO DENICHI

SOMA GENICHIRO

(22)Date of filing : 20.08.1990

(72)Inventor : SOMA GENICHIRO

YOSHIMURA ATSUSHI

TSUKIOKA DAISUKE

MIZUNO DENICHI

OSHIMA HARUYUKI

54) NOVEL BACTERIUM, NOVEL LPS, NOVEL IMMUNOFUNCTION-ACTIVATING AGENT, NEW
IMMUNOFUNCTION-ACTIVATING AGENT FOR ANIMAL

(57)Abstract:

NEW MATERIAL: A LPS-producing gram negative short Bacillus bacterium(FERN P-3509). Shape: short culmed shape, not moving and negative to Gram stain; growth state: forms a yellow-creamy round and opaque colony in the standard agar medium; physiological properties: positive Voges-Proskauer reaction, O-F test, etc., and negative to indole-producing reaction, etc.; the utilization of carbon sources: utilizes lactose, rhamnose, etc., not utilize adonite, inositol, etc. SE: A bacterium for producing a novel LPS which is an active ingredient for immunofunction-activating agents for animals.

PREPARATION: Wheat flour is mixed with distilled water, cultured with shaking at 37° C, diluted, spread on a standard agar medium and subsequently cultured. A colony producing the LPS is screened from the colonies thus produced by a test.

LEGAL STATUS

[date of request for examination]

[date of sending the examiner's decision of rejection]

[date of final disposal of application other than

examiner's decision of rejection or

application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平4-99481

⑬ Int.Cl.⁵

C 12 N 1/20
A 61 K 35/74
39/39
//C 12 N 1/20
C 12 R 1:01

識別記号

A
ABD A
AER

庁内整理番号

7236-4B
9165-4C
8829-4C

⑭ 公開 平成4年(1992)3月31日

審査請求 未請求 請求項の数 12 (全14頁)

⑮ 発明の名称 新規細菌、新規LPS、新規免疫機能活性化剤、新規動物用免疫機能活性化剤

⑯ 特 願 平2-218599

⑰ 出 願 平2(1990)8月20日

⑱ 発 明 者 柚 源 一 郎 東京都世田谷区東玉川1-10-21
⑲ 発 明 者 吉 村 淳 千葉県千葉市磯辺3-26-7
⑳ 発 明 者 月 岡 大 輔 千葉県千葉市春日1-21-17
㉑ 発 明 者 水 野 伝 一 神奈川県鎌倉市岡本18
㉒ 発 明 者 大 島 治 之 東京都八王子市館町1097 館ヶ丘団地2-10-513
㉓ 出 願 人 千葉製粉株式会社 千葉県千葉市新港17番地
㉔ 出 願 人 水 野 伝 一 神奈川県鎌倉市岡本18
㉕ 出 願 人 柚 源 一 郎 東京都世田谷区東玉川1-10-21

明 細 書

が、高層部は固定する。
ガスを生成する。

1 発明の名称

新規細菌、新規LPS、新規免疫機能活性化剤、新規動物用免疫機能活性化剤

2 特許請求の範囲

(1) 次の性質を有するLPS産生グラム陰性桿菌。

(a)形態

- ① 桿状
- ② 運動性なし
- ③ グラム染色性：-

(b)生育状態

- ① 懸液接種天培地：黄〜クリーム色で丸形の半透明なコロニーを形成する。
- ② SS天培地：白色で半透明なコロニーを形成する。
- ③ TSS天培地：斜面部での変化はない

(c)生理的性質

- ① フェーゲス・ブロスカウエル反応：+
- ② インドールの生成：-
- ③ 硫化水素の生成：-
- ④ クエン酸の利用：+
- ⑤ ツレアーゼ：-
- ⑥ オキシダーゼ：-
- ⑦ O/Fテスト：+

(d)産業上の利用性

- ① ラクトース：+
- ② アドニット：-
- ③ ラムノース：+
- ④ マンニット：+
- ⑤ エスクリン：+
- ⑥ イノシット：-
- ⑦ ソルビット：+
- ⑧ アラビノース：+
- ⑨ ラフィノース：+

④ シュクロース：+

(e) その他

- ① リジンの脱炭酸反応：-
- ② マロン酸の利用：-
- ③ アルギニンの分解：-
- ④ フェニルアラニンの脱アミノ化反応：-
- ⑤ オルニチンの脱炭酸反応：-

(2) 次の性質を有する L P S 産生グラム陰性桿菌。

(a) 形態

- ① 桿状
- ② 運動性なし
- ③ グラム染色性：-

(b) 生育状態

- ① 標準寒天培地：クリーム色で不透明なコロニーを形成する。
- ② S S 寒天培地：赤色で不透明なコロニーを形成する。
- ③ T S I 寒天培地：斜面部での変化はないが、高層部は黄変する。

(e) その他

- ① リジンの脱炭酸反応：-
- ② マロン酸の利用：+
- ③ アルギニンの分解：+
- ④ フェニルアラニンの脱アミノ化反応：-
- ⑤ オルニチンの脱炭酸反応：+

(3) 次の性質を有する L P S 産生グラム陰性桿菌。

(a) 形態

- ① 桿状
- ② 運動性なし
- ③ グラム染色性：-

(b) 生育状態

- ① 標準寒天培地：黄色で丸形の半透明なコロニーを形成する。
- ② S S 寒天培地：コロニーを形成しない。
- ③ T S I 寒天培地：斜面部での変化はないが、高層部は黄変する。ガスを生じない。

(c) 生理的性質

ガスを生成する。

(c) 生理的性質

- ① フォーグス・プロスカウエル反応：+
- ② インドールの生成：-
- ③ 硝化水素の生成：-
- ④ クエン酸の利用：+
- ⑤ ウレアーゼ：-
- ⑥ オキシダーゼ：-
- ⑦ O-F テスト：+

(d) 炭素源の利用性

- ① ラクトース：+
- ② アドニット：-
- ③ ラミノース：+
- ④ マンニット：+
- ⑤ エスクリン：+
- ⑥ イノシット：-
- ⑦ ソルビット：+
- ⑧ アラビノース：+
- ⑨ ラフィノース：+
- ⑩ シュクロース：+

- ① フォーグス・プロスカウエル反応：+
- ② インドールの生成：-
- ③ 硝化水素の生成：-
- ④ クエン酸の利用：+
- ⑤ ウレアーゼ：-
- ⑥ オキシダーゼ：-
- ⑦ O-F テスト：+

(d) 炭素源の利用性

- ① ラクトース：+
- ② アドニット：-
- ③ ラミノース：+
- ④ マンニット：+
- ⑤ エスクリン：+
- ⑥ イノシット：-
- ⑦ ソルビット：+
- ⑧ アラビノース：+
- ⑨ ラフィノース：+
- ⑩ シュクロース：+

(e) その他

- ① リジンの脱炭酸反応：-

④マロン酸の利用：+

⑤アルギニンの分解：-

⑥フェニルアラニンの脱アミノ化反応：-

⑦オルニチンの脱炭酸反応：-

(4) 次の特性を有する、請求項1記載の物質に由来するLPS。

分子量：5,000±1,000(SDS電気泳動法)

リン数：2±1/分子量5,000

ヘキサミン数：9±1/分子量5,000

KDO数：2±1/分子量5,000

(5) 次の特性を有する、請求項2記載の物質に由来するLPS。

分子量：6,500±2,500(SDS電気泳動法)

リン数：1~2/分子量5,000

ヘキサミン数：7±1/分子量5,000

KDO数：1~2/分子量5,000

(6) 次の特性を有する、請求項3記載の物質に由来するLPS。

3 発明の詳細な説明

[産業上の利用分野]

本発明は、新規な細菌、新規なLPS、新規な免疫能活性化剤、新規な動物用免疫能活性化剤に関する。

より詳細には、本発明は、3種の新規なアフラム菌のグラム陰性桿菌、それに由来する新規なLPS、及びそれらLPSを含む組成物、特に、感染症予防可能な新規な免疫能活性化剤、動物用免疫能活性化剤に関する。

[従来の技術]

生物には、生体の内部環境が外環境及び内因性の異物によって擾乱されるのを防ぎ、生体の恒常性を維持するための免疫能が備わっている。従って、免疫能の低下は健康の悪化、各種疾病の発病、老化促進の原因となり、その活性化は健康向上、各種疾病の発病阻止、治療、老化防止につ

分子量：6,500±2,500(SDS電気泳動法)

リン数：2±1/分子量5,000

ヘキサミン数：5±1/分子量5,000

KDO数：2±1/分子量5,000

(7) 請求項4記載のLPSを含む免疫能活性化剤。

(8) 請求項5記載のLPSを含む免疫能活性化剤。

(9) 請求項6記載のLPSを含む免疫能活性化剤。

(10) 請求項4記載のLPSを含む動物用免疫能活性化剤。

(11) 請求項5記載のLPSを含む動物用免疫能活性化剤。

(12) 請求項6記載のLPSを含む動物用免疫能活性化剤。

ながる。

このため、免疫能を活性化させる物質の提供が要請されており、現在、PSK[別名クレステン(興羽化学株式会社の登録商標)]、レンチナン(味の素株式会社の登録商標)、ベスタテン(日本化薬株式会社の登録商標)、ソニフィラン(科研製薬株式会社の登録商標)、OK-432[キャンサー ケモセラピー レポートジャーナル(Cancer Chemotherapy Reports Part I), vol. 58, No. 1, 10頁(1972)、別名ビバニール(中外製薬株式会社の登録商標)]等が知られている。

[発明が解決しようとする課題]

従来の免疫能活性化剤のうちで、PSK、レンチナン、ベスタテン、ソニフィランにはTNF産生能がないので、それらの免疫能活性化剤は低い。

一方、OK-432にはTNF産生能があるが、

大量投与が必要であることから、発熱、悪寒、血圧低下、血小板減少等の副作用の発生が避けられず、従って化学療法効果が小さい。更に、無菌な麻口投与や緩度投与では効果がないので、投与上の要室に欠ける。

ここで「TNF」とは、マクロファージにより産生される腫瘍壊死因子 (Tumor Necrosis Factor) の略称 [ザジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (The Journal of Biol. Chem., 260, 2345~2354頁 (1985年))] であり、マクロファージの活性が高まるにつれてその産生量は増していく。「マクロファージ」は、免疫担当細胞の一種であり、動物体内のほとんど全ての組織に分布し、殺子状の異物や体内の老廃細胞などを捕食して消化する大型のアモeba状細胞の総称である。

本発明は、これら従来技術の欠点に鑑み、新たな免疫賦能性化剤、動物用免疫賦能性化剤を提供するために新案されたものである。

小 要 略 の 名 称

- | | |
|-----------------------|---------|
| ①ダーク・ノザン・スプリングス | 米国 |
| ②I・カナディアン・ホワイト | カナダ |
| ③ハード・レッド・ウィンター・セミハード | 米国 |
| ④オーストラリアン・スタンダード・ホワイト | オーストラリア |
| ⑤ホロシ | 日本 |

LPSの分離

上記細菌から本発明のLPSを分離するには、ウェストファル (Westphal) 等が「インモックス イン カーボハイドレート ケミストリー (In Methods in Carbohydrate Chemistry) の vol. V [米国ニューヨークのアカデミックプレス (Academic Press) 社が1985年に発行] の83頁に記載した脂フェノール法を用い、更に、陰イオン交換樹脂で精製すればよい。

即ち、本発明は、高い免疫賦能活性化能を持つ新規な免疫賦能性化剤、動物用免疫賦能性化剤を提供すること、及び、その活性成分である新規なLPSを提供すること、及び、そのLPSの供給源となる新規な細菌を提供することを目的とする。

本発明のLPSは、各別に使用できることはもちろん、その重調される用途が阻害されない限り、それらの2種以上を任意に組み合わせ、又、更には他のいずれの物質とも組み合わせ使用できる。

【問題を解決するための手段】

細菌分離

本発明の3種の細菌は、本発明者等が検討した小豆からはその産地、種類を問わず分離されている。従って、いずれの産地、種類の小豆及びその加工品からも分離されると推定される。本発明者等がそれら3種の細菌を分離できることを確認した小豆粉の産地、種類は次の通りである。

即ち、菌体を蒸留水に懸濁した後、蒸留水と等容量の脂フェノールと共に攪拌し、次いで、遠心分離により水層を回収し、この水層を透析に付してフェノールを除去し、膜外濾過により濃縮して脂LPS成分を移、この成分を常法に従って、例えば、ファルマシア社製のPPLCシステムでファルマシア社製のモノQ-セファロース (Sepharose)、Q-セファロース (Sepharose) を使用して陰イオン交換クロマトグラフィーに付して精製し、更に、常法に従って乾燥すればよい。

以上の操作により、純度96%以上の精製品が得られる。

LPSの特性

従って実施例中で詳述する如く、本発明の3種のLPS (96%以上純度品) の特性は次の通りであった。

- ①分子重: 5,000±1,000 (SDS電気泳動法)

リン数: 2 ± 1 / 分子量 5,000ヘキサミン数: 9 ± 1 / 分子量 5,000KDO数: 2 ± 1 / 分子量 5,000③分子量: $6,500 \pm 2,500$ (SDS電気泳動法)リン数: $1 \sim 2$ / 分子量 5,000ヘキサミン数: 7 ± 1 / 分子量 5,000

KDO数: 1から2 / 分子量 5,000

④分子量: $6,500 \pm 2,500$ (SDS電気泳動法)リン数: 2 ± 1 / 分子量 5,000ヘキサミン数: 5 ± 1 / 分子量 5,000KDO数: 2 ± 1 / 分子量 5,000

提供の形態

本発明のLPSはそのまま、或いは任意の程度に濃縮した形で提供できる。又、保存性を高めるために、凍結乾燥や噴霧乾燥などの任意の手段により乾燥粉末として提供することもできる。これらはいずれも常法で生産できる。

用)である。

TNF活性は、L-929細胞[プロシーディング オブ ナショナル アカデミー サイエンス オブ ユーエスエー 72, 3666~3670頁]に対する細胞毒性を基にして、次のようにして測定する。

L929細胞を、5%牛牛胎児血清を加えたイーグルミニマムエッセンシャル培地(以下、MEM培地と表す)で育成し、 8×10^4 個の細胞が100μlの円上培地に含まれる確にし、96穴の平底プレートで育種する。育種条件は37℃、2時間、5%CO₂、100%H₂Oであり、通常の細胞培養に用いられる方法でよい。その後、フクノマイシンDを培地中に終濃度1μg/mlとなるように加え、培養液の濃度を150μlとする。即座に、検体を適当にMEM培地で稀化したものを50μl加える(この稀釈率を適宜調整し、ED₅₀を求める事ができる)。更に、最終濃度200μlとなったL929細胞を上記条件で18時間培養する。

免疫活性化剤の測定

本発明のLPSの免疫活性化能は、マクロファージ活性を通じての肉因性TNF産生能により確認した。

肉因性TNF産生能試験

動物体内にTNFを産生させるためには、産生前駆(プライミング)段階と産生開始(トリガリング)段階とが必要であることは、カースワエル(Carswell)らにより、プロシーディング オブ ナショナル アカデミー サイエンス オブ ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA.) 72, 3号666~3670頁(1975年)に報告されており、その後、各段階で使用出来る薬剤の検討もすすめられている。プライミング段階開始のために投与される薬剤が「プライマー」(肉因性TNF産生促進剤)であり、トリガリング段階開始のために投与される薬剤が「トリガー」(肉因性TNF産生

促進剤)を測定するには、まず全培地を除去し、ついで、1%クリスタルバイオレットを含む1%メチルアルコール溶液を加えて固定染色する。クリスタルバイオレットは全有核細胞を染色するが、死細胞は染色後にプレート底面より水洗で除去されるので、生存細胞の結集から細胞障害活性を直接測定できる。この染色度をOD₅₅₀での吸光度を指標として測定し、対照群に対する染色度と比較する事で細胞障害活性を測定する。活性の定義は次の欄に行う。

L929細胞が50%生存できる検体の稀釈率(N)を求める。対照としてウサギTNS[腫瘍壊死血清(Tumor Necrosis Serum)]を使用し、このウサギTNSの活性n(単位/ml)を 2.4×10^4 単位/mg/mlのTNF-αを用いて決定する。このウサギTNSのED₅₀を求める稀釈率(C)を求める。

検体活性(単位/ml)は $\frac{N}{C} \times n$ で計算する。

LP Sの用途

本発明のLP Sは様々な用途に使用できる。

一つの用途は、その免疫機能活性化能をそのまま生かした免疫機能活性化剤、動物用免疫機能活性化剤である。

第2の用途は、その免疫機能活性化能を指標にして人間その他の動物の免疫機能をチェックするための免疫機能検査薬、動物用免疫機能検査薬である。

第3の用途は、その免疫機能活性化能の発現を誘発して配合される医薬部外品、化粧品、食品、機能性食品、飲料、飼料等である。

提供できる剤の製造方法

これら免疫機能活性化剤等のいずれもが常法で製造できる。例えば、免疫機能活性化剤、動物用免疫機能活性化剤は医薬品又は動物薬製造の常法に従って、錠剤として、或いは針剤、懸注射液として単独で、或いは他薬との配合物として処方できる。又、皮膚にはマクロファージが多いので、

1A中	酵母エキスを	2.5g
	ペプトン	5.0g
	ブドウ糖	1.0g
	カンテン	15.0g
pH	7.1±0.1	

③菌種が異なると考えられた、培養経過時間8時間目、10時間目に認められた黄〜クリーム色不透明コロニー（コロニー1）、クリーム色不透明コロニー（コロニー2）、黄色半透明コロニー（コロニー3）、乳白色不透明コロニー（コロニー4）、白色不透明な小さなコロニー（コロニー5）を上記と両種の別の標準天培地にまき、植え置き、一方で、コロニー1〜5の菌のグラム染色性、リムラス活性を調べた。ここで「リムラス活性」とは、1968年にレヴィン（Levin）により創案された、カプトガニ血球抽出液と発色合成基質を用いたエンドトキシン定量法であるリムラステストで陽性を示すことをさす。このリムラステストはLP S検出法として知られてお

皮膚塗布剤として投与するとより高い効果が得られる。

以下、実施例、実施例により本発明を更に詳細に説明する。

実施例1

①50mLコニングチューブに、1.09%の灰分を含む硬質小麦粉（カナダ産の1・カナディアン・ホワイト）1.04gを秤量して入れ、20mLの蒸留水を加えて50mg/mLの小麦粉液を調製した。

②この液を37℃の水浴中で振とう培養し、経過時間0時、1時、2時、3時、4時、5時、8時、10時、12時、20時、24時、48時に各0.5mLを採取し、10°〜10°希釈して、標準天培地（日本製薬社製の培地であり、下記の組成を持つ）に100μL宛をまき込み、生育数の測定、コロニーの観察を行った。

標準天培地（コード05618）

り、例えば、生化学工業株式会社からトキシカレーションシステムという名称で市販されている試薬セットを使用して実施できる。

上記コロニーのうち、コロニー4及びコロニー5（共にグラム染色性+）のリムラス活性はコロニー1〜3（共にグラム染色性-）に比べて極めて低かったので、以後の検討から除外、日本製薬社製の培地及びIDテスト・E B-20を使用して、コロニー1〜3の形態、生化学的性状を観察した。次の結果が得られた。

コロニー1を形成する菌種（900814-1）

（菌工研菌寄第11664号として平成2年8月20日から通商産業省工務技術院微生物工業技術研究所に寄託されている）

(a)形態

- ①菌様状
- ②運動性なし
- ③グラム染色性：-

(b)生育状態

① 菌落天増地：黄〜クリーム色で丸形の
不透明なコロニーを形成
する。

② SS 菌落天増地：白色で半透明なコロニー
を形成する。

[SS 菌落天増地：日本製薬コード 05031]

組成 1 中	肉エキス	5.0 g
	屈折酸塩	9.0 g
	ペプトン	7.5 g
	ラクトース	10.0 g
	クエン酸ナトリウム	8.5 g
	チオ硫酸ナトリウム	5.5 g
	クエン酸第二鉄	1.0 g
	ニュートラルレッド	0.025 g
	アリアントグリーン	0.033 g
	カンテン	13.5 g

pH 7.1 ± 0.1

③ TSI 菌落天増地：斜面部での変化はない
が、高層部は黄変する。
ガスを生成する。

[TSI 菌落天増地：日本製薬コード 05103]

組成 1 中	肉エキス	5.0 g
	NaCl	5.0 g
	ペプトン	15.0 g
	ラクトース	10.0 g
	シュクロース	10.0 g
	ブドウ糖	1.0 g
	クエン酸第二鉄	0.2 g
	チオ硫酸ナトリウム	0.2 g
	フェノールレッド	0.02 g
	カンテン	15.0 g

pH 7.6 ± 0.1

(c) 生理的性質

- ① フォーゲス・プロスカウエル反応：+
- ② インドールの生成：-
- ③ 硫化水素の生成：-
- ④ クエン酸の利用：+
- ⑤ ウレアーゼ：-
- ⑥ オキシダーゼ：-
- ⑦ O-F テスト：+

(d) 炭素源の利用性

- ① ラクトース：+
- ② アドニット：-
- ③ ラミノース：+
- ④ マンニット：+
- ⑤ エスクリン：+
- ⑥ イノシット：-
- ⑦ ソルビット：+
- ⑧ アラビノース：+
- ⑨ ラフィノース：+
- ⑩ シュクロース：+

(e) その他

- ① リジンの脱炭酸反応：-
- ② マロン酸の利用：-
- ③ アルギニンの分解：-
- ④ フェニルアラニンの脱アミノ化反応：-
- ⑤ オルニチンの脱炭酸反応：-

20 日から通商産業省工業技術院微生物工業技術
研究所に寄託されている)

(a) 形態

- ① 短棒状
- ② 運動性なし
- ③ グラム染色性：-

(b) 生育状態

- ① 菌落天増地：クリーム色で不透明なコ
ロニーを形成する。
- ② SS 菌落天増地：赤色で不透明なコロニー
を形成する。

③ TSI 菌落天増地：斜面部での変化はない
が、高層部は黄変する。
ガスを生成する。

(c) 生理的性質

- ① フォーゲス・プロスカウエル反応：+
- ② インドールの生成：-
- ③ 硫化水素の生成：-
- ④ クエン酸の利用：+
- ⑤ ウレアーゼ：-

コロニーを形成する細菌 (900814-2)

(特工研第 11865 号として平成 2 年 8 月

⑥オキシダーゼ：-

⑦O-Fテスト：+

(d)炭素源の利用性

①ラクトース：+

②アドニット：-

③ラムノース：+

④マンニット：+

⑤エスクリン：+

⑥イノシット：-

⑦ソルビット：+

⑧アラビノース：+

⑨ラフィノース：+

⑩シュクロース：+

(e)その他

①リジンの脱炭酸反応：-

②マロン酸の利用：+

③アルギニンの分解：+

④フェニルアラニンの脱アミノ化反応：-

⑤オルニチンの脱炭酸反応：+

⑥ウレアーゼ：-

⑦オキシダーゼ：-

⑧O-Fテスト：+

(d)炭素源の利用性

①ラクトース：+

②アドニット：-

③ラムノース：+

④マンニット：+

⑤エスクリン：+

⑥イノシット：-

⑦ソルビット：+

⑧アラビノース：+

⑨ラフィノース：+

⑩シュクロース：+

(e)その他

①リジンの脱炭酸反応：-

②マロン酸の利用：+

③アルギニンの分解：-

④フェニルアラニンの脱アミノ化反応：-

⑤オルニチンの脱炭酸反応：-

コロニー3を形成する菌質(900814-3)

(農工研菌第11886号として平成2年8月20日から通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されている)

(a)形態

①増殖状

②運動性なし

③グラム染色性：-

(b)生育状態

①乾燥寒天培地：灰色で丸形の半透明なコロニーを形成する。

②SS寒天培地：コロニーを形成しない。

③TSI寒天培地：斜面部での変化はないが、基層部は変化する。ガスを生成しない。

(c)生理的性質

①フォーグス・プロスカウエル反応：+

②インドールの生成：-

③硝化水素の生成：-

④ケエン酸の利用：+

⑤コロニー1、2、3をそれぞれ1%のL-肉汁培地[Difco(ディフコ)社のポリペプトン10g、同社の酵母エキス5g、和光純薬社の特級NaCl5gを蒸留水に入れ、NaOHでpH7.5に合わせ、オートクレープし、別途、予め調製しておいた和光純薬社の特級グルコースの40%溶液を400倍に希釈して加えて調製]に移し、37℃で一液瓶とし、5,000g、4℃で20分間遠心処理して菌質した。

⑥各菌体をそれぞれ50mlの蒸留水に懸濁し、これに50mlの90%熱フェノールを加えて65~70℃で20分間攪拌し、冷却後、10,000g、4℃で20分間遠心処理して、水層を回収した。フェノール層を更に2回上記と同一の操作に付した。3つの水層を合わせ、一夜透析してフェノールを除去し、内液を、アドヴァンテック・トヨー(ADVANTEC TOYO)社のUK-200を使用して限外濾過に付して分子重20万カット・オフにより濃縮した(N₂圧

2気圧)。

④この実験サンプルを、ファルマシア社製のQ-セファロース ファスト フロー (Q-Sepharose Fast Flow) を使って陽イオン交換クロマトグラフィーに付した。即ち、10mMトリス-HCl (pH7.5) と10mMのNaClを含む緩衝液で試料をカラムに付した後、400mMNaCl/10mMトリス-HCl (pH7.5) でリムラス活性成分を溶出させた。この溶出液を上記と同じ条件で限外濾過に付して脱塩、濃縮して、純度98%以上のLPSを得た。なお、純度は1MNaCl/10mMトリス-HCl (pH7.5) で溶出した。

各層体の結果は表1〜3の通りであった。なお、LPS量は、リムラステストによる大腸菌LPS換算値であり、質はフェノール-硫酸法で、蛋白質はローリー法で測定した。又、核酸量はOD₂₆₀での測定値に基づき(1OD=50μg)、純度(%)は次式に基づいて計算した。

$$\text{純度} = \frac{\text{乾燥収量} - (\text{蛋白質} + \text{核酸量})}{\text{乾燥収量}} \times 100$$

表3

層体900814-3

乾燥収量 (mg)	19.2
LPS (mg)	103.6
糖 (mg)	7.6
蛋白 (μg)	73
核酸 (μg)	<137
純度 (%)	99<

⑤分子量

各LPSを蒸留水に溶解して1mg/ml溶液を調製し、その4μlを1.5mlのトレフチューブに入れた。これに、別産、1mMのEDTAに2.5%SDS、5%メルカプトエタノール、10mMトリス塩 (pH8.0) を加えて調製したSDS懸濁液1μlを加え、この溶液を3分間沸騰水に浸した。ファルマシア社製のファストシステム (Fast System) を使用し、電極との間にSDS-バッファーストリップ

乾燥収量

表1

層体900814-1

乾燥収量 (mg)	8.8
LPS (mg)	19.8
糖 (mg)	3.1
蛋白 (μg)	86
核酸 (μg)	<181
純度 (%)	96<

表2

層体900814-2

乾燥収量 (mg)	10.4
LPS (mg)	75.6
糖 (mg)	2.5
蛋白 (μg)	84
核酸 (μg)	<108
純度 (%)	98<

(Buffer Strip) (ファルマシア社製) が介在せられた1μsの上記膜をゲル (ファルマシア社製のファスト ゲル グラディエント (Fast Gel Gradient 8-25) に浸し、最大電圧250V、最大電流10mAにセットして泳動を開始させた。泳動終了後、クマシー染色と銀染色における泳動を観察した。

クマシー染色では、染色液としてファルマシア製の0.1%ファスト ゲル ブルー (Fast Gel Blue) Rを、脱色液として、メタノール：酢酸：蒸留水 (容量比3:1:6) 溶液を使用し、次の順序で染色・脱色を行った。

- 1) 50℃で8分間染色
- 2) 50℃で5分間脱色
- 3) 50℃で8分間染色
- 4) 50℃で10分間脱色
- 5) 50℃で5分間脱色 (グリセロール、酢酸、蒸留水の容量比5:10:85溶液)

6) 乾燥

染色色は、次の順序で行った。

- 1) 50℃で2分間、洗淨液(エタノール、酢酸、蒸留水の容量比5:1:4混液)で処理
- 2) 50℃で2分間、洗淨液(エタノール、酢酸、蒸留水の容量比10:5:85混液)で処理
- 3) 50℃で4分間、洗淨液(エタノール、酢酸、蒸留水の容量比10:5:85混液)で処理
- 4) 50℃で6分間、増感液(8.3%グルタルジアルデヒド)で処理
- 5) 50℃で3分間、洗淨液(エタノール、酢酸、蒸留水の容量比10:5:85混液)で処理
- 6) 50℃で5分間、洗淨液(エタノール、酢酸、蒸留水の容量比10:5:85混液)で処理
- 7) 50℃で2分間、洗淨液(脱イオン水)で処理
- 8) 50℃で2分間、洗淨液(脱イオン水)で処理
- 9) 40℃で13分間、0.25w/v%硝酸銀で処理
- 10) 30℃で30秒間、洗淨液(脱イオン水)で

処理

- 11) 30℃で30秒間、洗淨液(脱イオン水)で処理
- 12) 30℃で30秒間、現像液(0.04v/v%ホルムアルデヒド+2.5w/v%炭酸ナトリウム洗淨液)で処理
- 13) 30℃で4分間、現像液(0.04v/v%ホルムアルデヒド+2.5w/v%炭酸ナトリウム洗淨液)で処理
- 14) 50℃で2分間、反応停止液(5%v/v%酢酸)で処理
- 15) 50℃で3分間、保存液(酢酸、グリセロール、蒸留水の容量比10:8:85混液)で処理

16) 乾燥

LPSは染色に染まるが、クマシー染色には染まらない性質を利用して染色帯を顕微鏡したら、紙付図面1に示されるように、本発明の3種のLPSの主要染色帯は分子重5,000付近に認められた。又、固体900814-1に由来するL

PS(以下、LPS1と称す)は分子重3万付近にややまとまった染色帯を示した。固体900814-2に由来するLPS(以下、LPS2と称す)は30,000から43,000の間に染色帯が認められるが、14,000以下の染色帯の染色度と比較すると、高分子のものは極めて少ないと推定される。重量、ヘキサミン量(後述する)からも、LPS2は最も割合含有率が低く、ついで、固体900814-3に由来するLPS(以下、LPS3と称す)、LPS1の順で高くなり、電気泳動で観察されたパターンと一致すると考えられる。又、LPS量/総乾燥収量の比もLPS2、LPS3、LPS1の順に低くなっている。以上の観察結果から、LPS2は比較的低分子のLPSが多く、次いで、LPS3、LPS1の順にその割合は少なくなると推定される。

④ リン含有量

チェントリバウ(Chen-Toribara)法【チェン等著、『アナリティカルケミストリ(Analytical Chemistry)』

vol.28, 1756~1758頁(1956年)に準拠して次の通りに行った。

LPS1、LPS2、LPS3を各別に蒸留水に溶解して、それぞれ、31.6μg、57.6μg、103.6μgのLPSを含む20μlの溶液を調製し、小試験管に入れた。20μlの50v/v%硝酸を添加し、180℃で2時間加熱した。次いで、20μlの10v/v%過塩素酸を添加した後にガスバーナーで1分間加熱して灰化させた。その後、0.5mlの蒸留水、次いで0.5mlの反応試薬(1mlの6N硝酸、2mlの蒸留水、2mlの2.5v/v%モリブデン酸アンモニウム及び1mlの10v/v%のアスコルビン酸を混合して調製し、その0.5mlを使用)を添加して室温で30分間放置した後に、820nmでの吸光度(OD_{820nm})を測定した。なお、検量線作成用の試料としては、リン酸二水素カリウム(和光純薬社製)を蒸留水で希釈し、リン酸重量としてそれぞれ2.5μg、1μg、0.25μg、0μgを含む0.5mlの溶液を

調製して使用した。なお、リン1gはリン酸二水素カリウム4.39gに相当する。結果を表4に示す。なお、吸光度を示す数値は、無機リンの塩（例えば、リン酸二水素塩）由来するものによる誤差を避けるために、加熱処理をしていない対照のデータを除いた値である。また、リン酸(P数)は、分子重5,000当たりの換算数である。

表4

LPS	吸光度	P量($\mu\text{g}/\mu\text{g}$)	P量(%)	P数
1	0.36	0.54(1/32)	1.7	2 \pm 1
2	0.31	0.46(1/58)	0.8	1 \sim 2
3	0.67	1.30(1/104)	1.3	2 \pm 1

P量=吸光度 \times 0.67

④ヘキサミン含有量

エルソン-モルガン(Ellison-Morgan)

(試薬A) 75 μL のアセチルアセトンと2.5mLの1.25N炭酸ナトリウムを混合して調製
(試薬B) 1.6gのp-メチルベンズアルデヒドと30mLの濃塩酸と30mLの98%エタノールを混合して調製

結果、LPS1、LPS2、LPS3のヘキサミン数はそれぞれ9 \pm 1/分子重5,000、7 \pm 1/分子重5,000、5 \pm 1/分子重5,000だった。

⑤KDO含有量

KDO(2-ケト-3-デオキシオクトネート)含有量をジフェニルアミン法【シャビール(Shabyl R.)等、アナリティカルバイオケム(Aналитический Биохим.), 58(1), 123~129頁(1974年)】に準拠して次の通りに行った。500mgのジフェニルアミン、5mLのエタノール、45mLの水酢酸、50mLの濃塩酸(全と和光純薬社製)を合わせてKDO抽出試薬を調製した。その500 μL に、(1)0.505mg

ss) 池(東京化学同人出版「生化学実験図解」No.4の377~378頁)に準拠して次の通りに行った。

LPSを蒸留水に溶解して1.58mg(LPS1)、2.88mg(LPS2)、5.18mg(LPS3)/mLの溶液を調製し、その100 μL をスクリーキャップ付きスピッツ(イワキガラス社製)に入れ、これに100 μL の8NHClを加えて110 $^{\circ}\text{C}$ で15時間加熱した。4NNaOHを約200 μL 添加してpH7とした。その100 μL を分取し、別のスクリーキャップ付きスピッツに入れ、200 μL の下記試薬Aを加えた後に、10 $^{\circ}\text{C}$ で1.5時間加熱し、次いで沸水で冷却した。次いで、100 μL を分取し、670 μL の98%エタノールを加え、更に、87 μL の下記試薬Bを加えた後に室温で1時間放置し、535nmで吸光度を測定した。検量線作製用試料としては0.20~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のN-アセチルグルコサミン(和光純薬社製)を使用した。

/mLのLPS1を含む250 μL 蒸留水溶液；
(2)0.576mg/mLのLPS2を含む250 μL 蒸留水溶液；(3)0.518mg/mLのLPS3を含む250 μL 蒸留水溶液；のいずれかを合わせ、100 $^{\circ}\text{C}$ の沸騰水中で33分間加熱後に冷水(24 $^{\circ}\text{C}$)中で30分間冷却し、ついで日立分光光度計320を使って420、470、830、850nmでの紫外線吸収を測定した(それぞれA₄₂₀、A₄₇₀、A₈₃₀、A₈₅₀とする)。標準試料としては、0.5 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ のKDOアンモニウム塩【米国シグマ(Sigma)社製】を含む蒸留水250 μL を使用した。

検体試料、標準試料それぞれについて、次式の値を求めた。

$$S = A_{420} - A_{470} + A_{830} - A_{850}$$

検体試料の値(S)はLPS1で0.109、LPS2で0.078、LPS3で0.098であった。標準試料の値(S)は0.248であり、蒸留水のみは0.005であった。この値の比較により、LPS1には2 \pm 1/分

子量5,000、LPS2には1~2/分子量5,000、LPS3には2±1/分子量5,000のKDDが含まれると推定された。

なお、これらの値は、LPS1を例にとると、次のように計算される。

溶液中に含まれるKDDの濃度を x ($\mu\text{mol}/\text{ml}$)とすると、

$$\frac{0.5}{0.246} = \frac{x}{0.108} \quad \therefore x = 0.221$$

従って、LPS1の1モル(5,000と仮定)に含まれるKDDのモル数を y とすると、

$$y = x \times 10^{-3} \times \frac{5,000}{0.505 \times 10^{-3}} = 2.19$$

以下は、本発明のLPSを含む製剤の処方例である。なお、LPS量は、リムラステストによる大腸菌LPS換算量である。

実施例2(飲料)

LPS1 0.04g

6% HPC乳剤 178g

ステアリン酸タルク 8g

バレイショデンプン 14g

以上を混合し、打錠して、0.1mgの小錠LPSを含む0.5gの錠剤400個を調製した。

実施例3(内服剤)

LPS1 1mg

精製水 100ml

実施例4(軟膏剤)

LPS1 0.1g

精製ノリン 80g

黄色ワセリン 適量
1000g

実施例5(注射剤)

LPS1 0.5mg

注射用生理食塩水 適量

合計 1000ml

実施例1

①各群2匹又は3匹のマウス(7週齢のオスC3H/He、平均体重25g)の尾静脈に、1匹当たりリムラス活性量で1、10、又は100 μg のLPS1、LPS2、LPS3を含む生理食塩水0.2mlを注射し、その1時間後に血清を採取し、L929細胞に対する毒性に基づいてTNF活性を測定した。結果を、各群2匹又は3匹の平均として表5に示す。

表5

検体	TNF活性 (単位/ml)		
	1 μg	10 μg	100 μg
LPS1	6.15(3)	25.80(2)	30.69(2)
LPS2	1.80(3)	7.47(2)	6.57(2)
LPS3	7.44(3)	16.19(2)	34.47(2)

()内はマウスの匹数を表す。

投与量、投与間隔、毒性値

本発明のLPSを免疫賦能活性化剤として、或いは、動物用免疫賦能活性化剤抗腫瘍剤動物用抗腫瘍剤として投与するさいの量、投与間隔は、当然、担当医師或いは獣医師の処置な管理下、投与対象の年齢、症状、体重、投与効果を勘案して個別に決定されるが、人間の成人(60kg)で、経口投与で1 μg ~100mg、静脈投与で10 μg ~1mg、経皮投与で100ng~1mgが1日1回の投与量の一定の目安となる。なお、動物では、牛、馬等の大型動物は上記の量の60分の1を体重1kg当たりの量の目安とし、豚、犬、猫等の中型、小型の動物ではその2倍量を体重1kg当たりの量の目安とし、鳥等の鳥類では更にその2倍量を体重1kg当たりの量の目安とし投与できる。

本発明により新規な組成、それによする新規なLPS、及びそれを含む新規な免疫賦活性剤、動物用免疫賦活性剤が提供される。

又、本発明のLPSは、常法により容易に医薬、動物薬、検査薬、医薬部外品、化粧品、食品、機能性食品、飲料、飼料その他の主成分として或は一成分として配合することができる。

4 図面の簡単な説明

第1図は、本発明のLPSの、SDS電気泳動におけるパターンを示す図である。

图中、1はLPS1の、2はLPS2の、3はLPS3のパターンを示す。

特許出願人 千葉製粉株式会社

代表者 須藤 俊樹 (ほか2名)

第1図

94,000

67,000

43,000

30,000

20,000

17,000

15,000

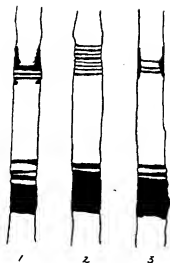
14,000

8,200

6,400

5,000

2,600



受 託 番 号 配 更 届

平成3年8月20日

特許庁長官 深沢 亘 殿

1. 事件の表示 平成2年特許審判第218599号
2. 発明の名称 新規細菌、新規LPS、新規免疫増進活性化剤、新規動物用免疫増進活性化剤
3. 手続をした者

事件との関係	代表出願人
郵便番号	260
住 所	千葉県千葉市新港17番地
氏 名	千葉製粉株式会社
	代表者 須藤 俊彌
4. 旧特許関係の名称 通商産業省工業技術院微生物工農技術研究所
5. 旧受託番号 微工研審特第11684号
6. 新特許関係の名称 通商産業省工業技術院微生物工農技術研究所
7. 新受託番号 微工研審特第8509号
8. 旧特許関係の名称 通商産業省工業技術院微生物工農技術研究所
9. 旧受託番号 微工研審特第11685号
10. 新特許関係の名称 通商産業省工業技術院微生物工農技術研究所
11. 新受託番号 微工研審特第3510号
12. 旧特許関係の名称 通商産業省工業技術院微生物工農技術研究所
13. 旧受託番号 微工研審特第11686号
14. 新特許関係の名称 通商産業省工業技術院微生物工農技術研究所
15. 新受託番号 微工研審特第3511号
16. 添付書類の目録

新受託番号を証明する書面

方式
審査

3通

This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.